



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 25 07 1991

F10000940898

94089

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

A 23J 3/00, 3/34, A 23C 9/14, 11/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	925620
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	10.12.92
(24) Alkupäivä - Löpdag	10.12.92
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	11.06.94
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.04.95

(71) Hakija - Sökande

1. Valio Oy, Meijeritie 4, 00100 Helsinki, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Tossavainen, Olli, Koroistentie 7 A 10, 00280 Helsinki, (FI)
2. Outinen, Marko, Servin Majan tie 1 C 20, 02150 Espoo, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä allergiaa aiheuttavien yhdisteiden poistamiseksi proteiinipitoisista
koostumuksista
Förfarande för avlägsning av allergiframkallande föreningar ur proteinhaltiga
sammansättningar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 421309 (A 23J 3/34), EP A 87247 (A 23J 3/00), NO B 169935 (A 23J 1/20),
US A 4293571 (A 23J 3/00), US A 4981704 (A 23J 1/20), US A 4293583 (A 23J 3/00),
WO A 91/10369 (A 23J 3/34)
Chemical Abstracts, vol. 110 (1989) 227942x, Biotechnol. Bioeng., vol. 33(10), 1989, p. 1324-1329

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä allergiaa aiheuttavien yhdisteiden poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolloin proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan proteolyyttisillä entsyymeillä proteiinihydrolysaatiksi, näin saatu hydrolysaatti kirkastetaan ja kirkas liuos otetaan talteen, näin saatu hydrolysaattiliuos johdetaan adsorptiohartsilla täytettyyn pylvääseen, jota huuhdotaan vedellä, otetaan talteen pylvään läpi tulleet liuokset, joista allergiaa aiheuttavat yhdisteet ovat poistuneet tai oleellisesti vähentyneet, tarvittaessa näin talteenotetuista liuoksista poistetaan suoloja, ja talteenotetut liuokset konsentroidaan ja haluttaessa kuivataan. Lisäksi keksinnön kohteena on näin saatu proteiinipitoinen koostumus sekä näin saadun, oleellisesti allergisoivia yhdisteitä sisältämättömän proteiinipitoisen koostumuksen käyttö äidinmaidonkorvikkeissa, erikoisravintovalmisteissa tai niiden komponentteina.

Uppfinningen avser ett förfarande för avlägsning av allergiförorsakande föreningar ur proteinhaltiga kompositioner genom spjälkning av det i den proteinhaltiga kompositionen ingående proteinet med proteolytiska enzymer till proteinhydrolysat, varefter det sålunda erhållna hydrolysatet klaras och den klara lösningen tillvaratas, den erhållna hydrolysatlösningen leds till en med adsorptionsharts fylld kolonn som sedan sköljs med vatten och de genom kolonnen passerade lösningarna tillvaratas, ur vilka de allergiförorsakande föreningarna avlägsnats eller väsentligen reducerats, och ifall behövt, avlägsnas salter ur de på detta sätt tillvaratagna lösningarna och de tillvaratagna lösningarna koncentreras och torkas ifall önskvärt. Dessutom avser uppfinningen en på detta sätt erhållen proteinhaltig komposition och användningen av en på detta sätt erhållen proteinhaltig komposition, vilken väsentligen saknar allergiframkallande föreningar, i modersmjölk ersättningar, i speciella livsmedelprodukter eller som komponenter i dessa.



Menetelmä allergiaa aiheuttavien yhdisteiden poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista

5 Keksinnön kohteena on menetelmä allergiaa aiheuttavien yhdisteiden poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolloin saadaan erittäin neutraalin makuinen, lähes mauton, proteiinipitoinen koostumus, josta allergiaa aiheuttavat yhdisteet on poistettu kokonaan tai suurimmalta osin.

10 Saatu proteiinipitoinen koostumus soveltuu erinomaisesti käytettäväksi esim. maito- ja soija-allergiapotilaille tarkoitetuissa äidinmaidonkorvikkeissa. Samoin se soveltuu käytettäväksi esim. kliinisissä ravintovalmisteissa, joissa tarvitaan peptideiksi pilkottua proteiinia, 15 mutta ei suurikokoisia peptidirakenteita.

 Maito- tai soija-allergia on yleensä pienten lasten sairaus. Maitoallergiaa esiintyy yleensä n. 0,5 - 7 %:lla vastasyntyneistä, Suomessa esiintyvyys on n. 2 - 3 % vastasyntyneistä (S. Similä et al., Suomen lääkärilehti 45 20 (11) (1990) 1039-1042). Lapsi herkistyy lehmänmaidon proteiinille yleensä ensimmäisten elinvuosiensa aikana saadessaan vierasta lehmänmaidon proteiinia ravinnossaan. Jo pienetkin proteiinimäärät voivat aiheuttaa tämän herkistymisen, esim. äidinmaito voi sisältää äidin nauttimia maitoproteiineja siinä määrin, että lapsi herkistyy niille. 25 Usein allergian aiheuttajana on kuitenkin lehmänmaito tai kaupalliset äidinmaidonkorvikkeet. Ohutsuolen seinämän ollessa vielä kehittymätön, se läpäisee myös suurimolekyyllisiä proteiineja ja niiden osia, jolloin lapsi herkistyy näille proteiineille ja suolen seinämän kehittyminen häiriintyy. 30 Maitotuotteet voivat aiheuttaa voimakkaita reaktioita allergikolle, kuten oksentelua, nuha- ja yskäoireita, ripulia, nokkosihottumaa, kutinaa, hengenahdistusta, suolisto-oireita ja pahimmassa tapauksessa anafylaktisen shokin. Allergiaoireiden pitkittyessä yleensä myös lapsen 35

kasvu häiriintyy. Hoidettaessa asianmukaisesti allergia häviää yleensä kolmanteen ikävuoteen mennessä. Tähän ikään asti se on kuitenkin vakava ongelma, koska maito on imeväisikäisille keskeinen ravintolähde. Allergian hoidossa noudatetaan usein maitovapaata dieettiä siirtymällä soijamaidon käyttöön. Kuitenkin soijamaidon käyttäjistä noin 30 % herkistyy soijaproteiineille. Tämän vuoksi onkin jo kehitetty eräitä proteiinihydrolysaatteihin perustuvia äidinmaidonkorvikkeita, joiden proteiini on entsyymaattisesti pilkottu pienikokoisiksi peptideiksi ja vapaiksi aminohapoiksi.

Maito- ja soija-allergikoille tarkoitetuissa äidinmaidonkorvikkeissa ja erikoisravintovalmisteissa allergisoivat proteiinit ja antigeeniset pilkkoutumistuotteet eli suurikokoiset peptidit tulee eliminoida mahdollisimman täydellisesti.

Yleisesti on tunnettua, että hypoallergista proteiinia voidaan valmistaa hydrolysoimalla proteiini entsyymaattisesti pieniksi peptideiksi ja vapaiksi aminohapoiksi ja erottamalla pilkkoutumattomat proteiinit ja suurikokoiset peptidit ultrasuodattamalla (Takase et al., J. Dairy Sci. 62 (1978) 1570-1576, Jost et al., Food Techn. 41 (10) (1987) 118, Mannheim et al., J. Food Sci. 55 (2) (1990) 381-390). Näin valmistettujen hydrolysaattien ongelmina ovat usein kuitenkin a) kitkerä tai epämiellyttävä maku ja b) osin pilkkoutumattomat proteiinirakenteet, jotka voivat aiheuttaa erityisesti herkille potilaille oireita.

Näiden ongelmien välttämiseksi eräät valmistajat ovat käyttäneet aktiivihiilikäsittelyä parantamaan hydrolysaatin ja siten myös siitä valmistettavan tuotteen makua ja poistamaan hydrolysaatista isokokoisia peptideja (J. Knights, Processing and Evaluation of the Antigenicity of Protein Hydrolysates, teoksessa Nutrition for Special Needs in Infancy, toim. F. Lifshitz, Marcel Dekker, New York 1985 ss. 105-115). Tämän tunnetun menetelmän puuttee-

na on kuitenkin se, että proteiinihydrolysaatissa olevista suurikokoista proteiineista saadaan aktiivihiiplikäsittelyllä pois vain noin puolet; J. Knightsin edellä mainituksa artikkelissa suurikokoisten proteiinien määrä aleni 5 aktiivihiiplikäsittelyssä 2,4:stä 1,3:een μg kaseiniekvivalentteja/g. On myös huomattava, että aktiivihiihi ei useinkaan ole regeneroitavissa uudelleenkäyttöä varten, ja lisäksi aktiivihiiheen adsorboituneet pienikokoiset proteiinit alentavat kokonaissaantoa.

10 Nyt on kuitenkin yllättäen todettu, että suurikokoiset peptidit voidaan poistaa tehokkaasti proteiinipitoisista koostumuksista käyttäen adsorptiohartsia. Se pystyy adsorboimaan suurikokoiset peptidirakenteet, kuten allergiaa eräillä henkilöillä aiheuttavat peptidirakenteet, ja samalla poistamaan kitkeryyttä aiheuttavia pepti- 15 dejä hydrolysaatista.

Tämän uuden menetelmän olennaisena etuna aktiivihiiplikäsittelyyn nähden on, että adsorptiohartsia pystyy alentamaan hydrolysaatin jäännösproteiiniekvivalenttipitoisuuden huomattavasti alemmalle tasolle kuin aktiivihii- 20 li kirjallisuuden mukaan ja toisaalta adsorptiohartsia kestää uudelleenregenerointia jopa useiden vuosien ajan, mikä tekee käsittelystä edullisen.

Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu hyvin erilaisista proteiinilähteistä (esim. heraproteiinista tai kaseiinista) valmistettujen hydrolysaattien käsittelyyn ja sillä voidaan käsitellä myös proteiinipitoisuudeltaan (kok.Nx6,38) erilaisia hydrolysaatteja. 25

Keksinnön kohteena on siten menetelmä allergiaa aiheuttavien yhdisteiden poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että 30

a) proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan proteolyytteisillä entsyymeillä proteiinihydrolysaatiksi, jonka hydrolyysiaste (alfa-amino-N/kok.N) 35 on 20 - 60 %,

b) näin saatu hydrolysaatti kirkastetaan, edullisesti sentrifugoimalla tai ultrasuodattamalla ja kirkas liuos otetaan talteen,

5 c) saatu hydrolysaattiliuos johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi virtausnopeudella 0,2 - 4 pylvään tilavuutta tunnissa lämpötilassa 5 - 70 °C siten, että hydrolysaattiliuoksessa on 40 - 500 g kuiva-ainetta 100 ml hartsia kohti,

10 d) hartsikäsittelyn lopuksi pylväs huuhdotaan vedellä, jonka lämpötila on 5 - 70 °C,

e) otetaan talteen pylvään läpi tulleet liuokset,

f) talteenotetuista liuoksista poistetaan tarvittaessa suoloja, ja

15 g) talteenotetut liuokset konsentroidaan 40 - 70 % kuiva-ainepitoisuuteen ja haluttaessa kuivataan.

Prosessin ensimmäisessä vaiheessa proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan proteolyyttisillä entsyymeillä siten, että hydrolysoitumisaste (alfa-amino-N/kokonais-N) on 20 - 60 %.

20 Käsiteltävä proteiinipitoinen koostumus voi olla mikä tahansa proteiinipitoinen koostumus, esimerkiksi heraproteiinia ja/tai kaseiinia sisältävä liuos. Heraproteiinijauheessa proteiinipitoisuus voi vaihdella välillä 35 - 85 paino-%.

25 Lähtöaineen proteiinipitoisuus vaikuttaa tuotteen proteiinipitoisuuteen. Jos halutaan tuotteen sisältävän mahdollisimman paljon proteiinia ja vähän esimerkiksi laktoosia, lähtöaineen proteiinipitoisuuden tulisi olla mahdollisimman korkea.

30 Proteolyyttisenä entsyyminä voidaan käyttää esimerkiksi trypsiiniä, pankreatiinia tai mikrobiproteaasia tai näiden yhdistelmää. Sopiva mikrobiproteaasientsyymi on esimerkiksi Alcalase 0,6 L (Novo, Tanska), joka on tuotettu Bacillus licheniformis -mikrobilla.

Entsymbaattisen hydrolyysin jälkeen proteiinihydrolysaatti kirkastetaan, edullisesti sentrifugoimalla tai ultrasuodattamalla pilkkoutumattoman proteiinin ja suurimolekyylisten peptidien poistamiseksi ja kirkas liuos otetaan talteen.

Talteenotettu kirkas hydrolysaattiliuos voidaan haluttaessa konsentroida haihduttamalla. Tällöin sopiva kuiva-ainepitoisuus on 10 - 30 paino-%. Näin saatu konsentraatti voidaan johtaa suoraan jatkokäsittelyyn tai sitä voidaan säilöä +5 °C:ssa ennen jatkokäsittelyä. Konsentraatti voidaan haluttaessa myös kuivata jauheeksi esimerkiksi sumutuskuivaimella ennen jatkokäsittelyä. Tällöin se kuitenkin haihdutetaan 30 - 50 paino-% kuiva-ainepitoisuuteen ennen kuivausta.

Ennen adsorptiohartsikäsittelyä proteiinihydrolysaattikonsentraatti tai -jauhe liuotetaan kuumaan veteen, edullisesti siten, että liuoksen kuiva-ainepitoisuudeksi tulee 10 - 30 paino-%.

Adsorptiohartsikäsittelyssä edellä saadusta hydrolysaattiliuoksesta adsorboidaan hartsiin suurikokoiset peptidit, jotka aiheuttavat allergiaa eräille henkilöille, johtamalla mainittu hydrolysaattiliuos adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi virtausnopeudella 0,2 - 4 pylvään tilavuutta tunnissa.

Adsorptiohartsikäsittelyssä hartsilla täytetyn pylvään läpi johdetaan hydrolysaattiliuosta, jossa on 40 - 500 g kuiva-ainetta 100 ml hartsia kohti.

Adsorptiohartsikäsittely voidaan suorittaa kirkastetun hydrolysaattiliuoksen pH:n ollessa 2 - 10, edullisesti 5,5 - 7,5. Edullisinta on kuitenkin käsitellä hartsilla neutraalia liuosta, jonka pH on 6,5 - 7,0, koska tällöin ei tarvita pH-säätöä hydrolyysivaiheen jälkeen ja tuotteen suolapitoisuus pysyy alempana. Haluttaessa liuoksen pH:ta voidaan kuitenkin säätää esimerkiksi sitruunahapolla, elintarvikelaatuksella HCl:lla tai NaOH:n, KOH:n ja Ca(OH)_2 :n seoksella.

Adsorptiohartsina voidaan käyttää mitä tahansa adsorptiohartsityyppeä, esim. polystyreenipohjaista hydrofobista hartsia, kuten Amberlite XAD-16 tai XAD-761, joita valmistaa Rohm & Haas (Ranska). Ennen hydrolysaattiliuoksen johtamista hartsilla täytetyn pylvään läpi hartsi regeneroidaan sinänsä tunnetulla tavalla.

Hartsikäsittely voidaan yleensä suorittaa lämpötilassa 5 - 70 °C. Edullisin hartsikäsittelylämpötila on noin 30 °C, jolloin liuoksen jäähdytykseen tai lämmitykseen ei tarvitse käyttää lisäenergiaa.

Hartsikäsittelyn lopuksi pylväs huuhdotaan vedellä, jonka lämpötila on 5 - 70 °C, edullisesti noin 30 °C, samalla virtausnopeudella, jolla proteiinihydrolysaattiliuosta edellä johdettiin ko. pylvään läpi.

Menetelmä voidaan siis toteuttaa joko siten, että hartsikäsittely suoritetaan välittömästi hydrolysointivaiheen jälkeen tai siten, että hartsikäsittely suoritetaan myöhemmin.

Hartsikäsittelyn lopuksi otetaan talteen pylvään läpi tulleet liuokset, joista allergiaa aiheuttavat yhdisteet ovat poistuneet tai niiden määrä on ainakin oleellisesti vähentynyt.

Adsorptiohartsikäsittelyssä hydrolysaatin koostumus muuttuu vain vähän. Taulukossa 1 on esitetty kuivatun hydrolysaatin koostumus ennen adsorptiohartsikäsittelyä XAD-16 -hartsilla ja sen jälkeen.

Taulukko 1: Hydrolysaatin koostumus

	<u>Komponentti</u>	<u>ennen käsittelyä</u>	<u>käsittelyn jälkeen</u>
	Vesi, %	4,9	5,2
5	Rasva, %	0,4	0,6
	Laktoosi, %	56,2	59,2
	Proteiini		
	(Nx6,38), %	23,3	19,5
	Tuhka, %	5,9	6,2
10	Na, mg/kg	8200	9200
	K, mg/kg	18000	18800
	Ca, mg/kg	3300	3000
	Cl, mg/kg	6500	7400
	P, mg/kg	3000	3300
15	alfa-amino-N/ kokonais-N (%)	49,6	52,0
	<u>Aminohappokoostumus</u> <u>(% proteiinista)</u>	<u>Ennen</u> <u>käsittelyä</u>	<u>Käsittelyn</u> <u>jälkeen</u>
20	Asparagiinihappo	9,5	11,1
	Treoniini	6,6	6,8
	Seriini	4,6	5,0
	Glutamiinihappo	16,8	20,0
	Proliini	6,1	5,9
25	Glysiini	2,0	2,0
	Alaniini	5,0	5,3
	Valiini	5,7	6,2
	Metioniini+Kystiini	3,8	4,0
	Isoleusiini	6,5	4,9
30	Leusiini	10,9	10,3
	Tyrosiini	4,1	3,2
	Fenyylialaniini	4,1	2,4
	Lysiini	9,0	9,9
	Histidiini	1,8	2,3
35	Arginiini	3,1	3,6

4,0

5,0

3,5

4,0

7,0

6,0

5,5

Hydrolysaattien aminohapoista oli n. 25 % vapaina aminohappoina sekä ennen adsorptiohartsikäsittelyä että sen jälkeen, joten hartsi ei vaikuttanut vapaiden aminohappojen osuuteen.

5 Taulukosta 1 nähdään, että hartsikäsittelyssä tuotteen proteiinipitoisuus laskee hieman, mutta muut hydrolysaatin komponentit kuin proteiini tulevat pääosin suoraan pylvään läpi. Hydrolyysiaste (alfa-amino-N/kok.N) nousee käsittelyssä jonkin verran, mikä myös kertoo, että hart-
10 siin tarttuu ensisijaisesti suurikokoisia peptidejä. Aminohappokoostumus muuttuu myös hyvin vähän, ainoastaan tyrosiinin ja fenyylialaniinin yhteinen määrä putoaa alle FAO:n suosituspitoisuuden. Tämä on kuitenkin helposti korjattavissa lisäämällä käsittelyn jälkeen tarvittava määrä
15 fenyylialaniinia hydrolysaattiin.

Hartsikäsittelyssä saanto oli 87 % kuiva-aineen suhteen ja koko hydrolysaatin valmistusprosessissa saanto oli 81 %, joten hartsikäsittely ei huonontanut prosessin saantoa merkittävästi antamaansa etuun verrattuna.

20 Talteenotetuista, oleellisesti allergiaa aiheuttavia yhdisteitä sisältämättömistä liuoksista poistetaan tarvittaessa suoloja, kuten ylimääräistä kloridia tai natriumia esimerkiksi elektrodialysillä.

Lopuksi talteenotetut liuokset konsentroidaan kuiva-ainepitoisuuteen 40 - 70 paino-% ja haluttaessa ne voidaan kuivata jauheeksi kylmä- tai sumutuskuivauksella.

Keksinnön mukaisen menetelmän edullisuutta lisää se, että käytetty adsorptiohartsi voidaan regeneroinnin jälkeen käyttää uudelleen.

30 Heraproteiinien pääkomponenttia β -laktoglobuliinia (B-LG) tai sen ehjiä rakenteita sisältäviä peptidejä voidaan analysoida tarkasti immunokemiallisella ELISA-menetelmällä (Enzyme linked immunosorbent assay), joka pystyy havaitsemaan hyvin alhaisia pitoisuuksia. Tätä ELISA-menetelmää käytetään yleisesti, kun halutaan tutkia heraprote-
35

iini-jäämiä esimerkiksi äidinmaidossa. Tällä menetelmällä voidaan myös todeta allergiaa aiheuttavan β -laktoglobuliinin ja sen säilyneiden osien mahdollinen läsnäolo maitoallergikoille tarkoitetuissa äidinmaidonkorvikkeissa.

5 Edellä mainitulla ELISA-menetelmällä mitattuna heraproteiinihydrolysaatin sisältämä B-LG-ekvivalenttipitoisuus ja kitkeryys vaihtelevat jälkikäsitteystä riippuen seuraavasti:

10 Taulukko 2: Hydrolysaatin sisältämä B-LG-ekvivalenttipitoisuus ja kitkeryys

	<u>Käsittely</u>	<u>Kitkeryys</u> <u>(0 - 4)</u>	<u>B-LG-pit.</u> <u>(μg/g k.a.)</u>
15	heraproteiinihydr. ilman jälkikäsitteystä	3	400
20	heraprot.hydr. + ultrasuodatus (20000 cut off)	3	0,82
25	heraprot.hydr. + ultrasuodatus (6000 cut off)	3	0,30
30	heraprot.hydr. + ultrasuodatus (20000 cut off) + adsorptiohartsikäs.	0	0,002-0,01

35 Kirjallisuudessa esitettyyn, aktiivihilikkäsittelyllä kaseiinihydrolysaatilla saatuun arvoon 1,3 μ g/g nähden (Knights et al., 1985) adsorptiohartsikkäsittely mahdollisti huomattavasti alemman antigeenitason tuotteessa.

Adsorptiohartsikäsittely alensi hydrolysaatin B-LG-ekvivalenttipitoisuutta n. 80 - 400-kertaisesti, kun aktiivihii-
likäsittelyssä edellä mainittiin n. 2-kertainen alenemi-
nen. Hartsikäsittelyn hydrolysaatin B-LG-ekvivalenttipi-
toisuus oli yleensä samalla tasolla riippumatta esim. hyd-
rolysaatin proteiinipitoisuudesta. Siten menetelmä sopii
etenkin runsaasti proteiinia sisältäville hydrolysaateil-
le, jolloin saadaan alhaisin B-LG-ekvivalenttipitoisuus
suhteessa proteiinin määrään.

10 B-LG-ekvivalenttipitoisuuden alentaminen ultrasuo-
dattamalla 6000 cut off -kalvolla ei ole käytännöllistä,
sillä tällöin permeaatin virtausnopeus pienenee ja siis
prosessin tehokkuus alenee huomattavasti sekä saanto heik-
kenee verrattuna 20000 cut off -kalvolla saatavaan.

15 Mitä todennäköisimmin myös muiden proteiinikompo-
nenttien kuin B-LG:n (esim. alfa-laktalbumiini, naudan
seerumialbumiini ja immunoglobuliinit) jäämätitoisuudet
alenevat adsorptiohartsikäsittelyssä. Tätä ei kuitenkaan
voitu seurata, sillä ELISA-menetelmää muita proteiinilaje-
ja kohtaan ei ollut käytettävissä.

20 Keksinnön mukaisesti saatua proteiinipitoista koos-
tumusta, josta allergiaa aiheuttavat yhdisteet on poistet-
tu joko kokonaan tai suurelta osin, voidaan käyttää äidin-
maidonkorvikkeissa ja erikoisravintovalmisteissa tai näi-
den komponentteina.

25 Seuraavissa esimerkeissä kuvataan keksintöä yksi-
tyiskohtaisemmin.

Esimerkki 1

30 A) Liuotettiin 100 kg 75 % proteiinia sisältävää
heraproteiinijauhetta 1900 litraan 50-asteista vettä (5 %
liuos jauheen suhteen). Kuumennettiin liuos 90 °C:een 10
minuutiksi samalla sekoittaen ja jäädytettiin takaisin 50
°C:een. Säädettiin pH 5 M Ca(OH)₂:lla 8,5:een. Lisättiin
pankreatiini- (4xUSP, Scientific Protein Laboratories,
35 Inc., USA) ja Alcalase 0,6 L -entsyymejä (Novo, Tanska) ja

annettiin hydrolysoitua niin, että hydrolyysiasteeksi (alfa-amino-N/kok.N) tuli 39 %. Hydrolyysin kuluessa pH:n annettiin laskea 7,0:aan, jossa se pidettiin 10 % $\text{Ca}(\text{OH})_2$:lla. Hydrolyysin päätteeksi liuos kuumennettiin 95 °C:een, 5 min. Jäähdytettiin 40 °C:een ja ultrasuodatettiin 20000 cut off -kalvoilla. Saatu permeaatti kerättiin talteen ja haihdutettiin n. 10 % k.a.-pitoisuuteen. Hydrolyysiaste (alfa-amino-N/kok.N) oli 40,3 %. Tiiviste säilytettiin 5° C:een jäähdytettynä.

10 B) Pakattiin laboratoriomittaiseen kolonniin 30 cm³ regeneroitua XAD-16 -adsorptiohartsia (Rohm & Haas) ja temperoitiin pylväs 30 °C:een. Lämmitettiin 126 cm³ hydrolysaattitiivistettä 30 °C:een. Tämä vastaa 42 g hydrolysaatin kuiva-ainetta 100 cm³ hartsia kohden. Liuoksen pH
15 oli tällöin 6,5 - 7,0, joten sitä ei tarvinnut säätää. Liuos johdettiin pylvääseen nopeudella 30 ml/h. Lopuksi huuhdottiin pylväs 40 cm³:llä 30-asteista vettä. Liuokset yhdistettiin ja pakkaskuivattiin jauheeksi.

20 Ennen hartsikäsittelyä hydrolysaatin B-LG-ekvivalenttipitoisuus oli 3,9 µg/g kuiva-ainetta ja hartsikäsittelyn jälkeen kyseinen pitoisuus oli 0,01 µg/g kuiva-ainetta, joten B-LG-pitoisuus aleni käsittelyssä 390-kertaisesti. Jauhe oli maultaan neutraalin makuista eikä lainkaan kitkerää.

: 25 Hydrolysaatin koostumus ennen hartsikäsittelyä ja sen jälkeen on esitetty taulukossa 3.

:

..

Taulukko 3: Hydrolysaatin koostumus ennen hartsikä-
sittelyä ja sen jälkeen

	<u>Komponentti</u>	<u>Ennen käsittelyä</u>	<u>Käsittelyn jälkeen</u>
5	Proteiini % k.a:sta	72,6	68,5
	Laktoosi % k.a:sta	5,5	5,8
	Tuhka % k.a:sta	6,4	6,6
	Na mg/kg k.a.	4100	4700
	K mg/kg k.a.	8500	9300
10	Ca mg/kg k.a.	13800	14300
	Cl mg/kg k.a.	4100	2600
	P mg/kg k.a.	1800	2100
	alfa-amino-N/kok.N (%)	40,3	43,8

15 Esimerkki 2

Toimittiin kuten esimerkin 1 A-kohdassa, mutta tiiviste haihdutettiin 50 % kuiva-ainepitoisuuteen ja kuivatettiin jauheeksi sumutuskuivaamalla.

Esimerkki 3

20 Esimerkissä 2 valmistettua jauhetta liuotettiin veteen 10 % liuokseksi. Lämpötila säädettiin 30 °C:een ja 126 cm³ 10 % liuosta ajettiin regeneroidun 30 cm³:n XAD-16 -pylvään läpi kuten esimerkissä 1B. Liuokset koottiin yhteen ja kuivatettiin jauheeksi. B-LG-ekvivalenttipitoisuus
25 oli alentunut kuten esimerkissä 1B ja tuote oli neutraalin makuista vailla kitkeryyttä.

Esimerkki 4

30 126 cm³ esimerkin 1 A-kohdassa valmistettua hydrolysaattia johdettiin esimerkin 1 B-kohdan mukaisesti regeneroituun XAD-16 -pylvääseen, mutta pumppausnopeus oli nyt 120 cm³/h. Liuokset kuivatettiin jauheeksi pakkaskuivaamalla.

Käsitellyn hydrolysaatin B-LG-ekvivalenttipitoisuus oli 0,01 µg/g kuiva-ainetta eli vähennys oli 390-kertainen. Tuote oli neutraalin makuinen eikä lainkaan kitkerä.

Esimerkki 5

Kaseiinihydrolysaattia valmistettiin vastaavalla tavalla kuin esimerkin 1 A-kohdassa. 10-prosenttista tiivistettä käsiteltiin samalla tavalla kuin esimerkin 1 B-kohdassa. Liuokset kerättiin talteen ja pakkaskuivattiin jauheeksi.

Ennen hartsikäsittelyä kaseiinihydrolysaatti sisälsi B-LG-ekvivalentteja 0,16 $\mu\text{g/g}$ kuiva-ainetta ja käsitteilyn jälkeen 0,01 $\mu\text{g/g}$ kuiva-ainetta eli B-LG-pitoisuus aleni 16-kertaisesti. Samalla kaseiinihydrolysaatin kitkeräys poistui ja tuote oli lähes mauton.

Kaseiinihydrolysaatin sisältämä B-LG oli tullut kontaminaationa kaseiinin valmistusprosessista. Se saattaa olla peräisin jo maidon pastöroinnin aiheuttamasta kompleksimuodostuksesta B-LG:n ja kappa-kaseiinin välillä.

Esimerkki 6

Esimerkin 1 A-kohdassa valmistettua hydrolysaattia käsiteltiin esimerkin 1 B-kohdan mukaisesti adsorptiohart-silla, mutta hartsi oli tyyppiä XAD-761 (Rohm & Haas). Käsitteily alensi hydrolysaatin B-LG-pitoisuuden 3,9:stä 0,04:ään $\mu\text{g/g}$ kuiva-ainetta eli alennus oli 98-kertainen. Jauhe oli maultaan neutraali eikä lainkaan kitkerä.

Esimerkki 7

Heraproteiinihydrolysaattia valmistettiin nyt kuten esimerkin 1 A-kohdassa, mutta entsyyminä käytettiin yksinomaan trypsiiniä. 126 cm^3 saatua hydrolysaattia johdettiin regeneroituun 30 cm^3 :n XAD-16 -pylvääseen nopeudella 30 ml/h 30 °C:n lämpötilassa. Lopuksi pylväs huuhdottiin 40 cm^3 :llä 30-asteista vettä, joka yhdistettiin läpitulleeeseen hydrolysaattiliuokseen. Tämä pakkaskuivattiin jauheeksi.

Ennen hartsikäsittelyä hydrolysaatti sisälsi B-LG-ekvivalentteja 0,19 $\mu\text{g/g}$ kuiva-ainetta ja hartsikäsittelyn jälkeen 0,01 $\mu\text{g/g}$ kuiva-ainetta eli B-LG-ekvivalenttipitoisuus aleni 19-kertaisesti. Tuote ei ollut lainkaan kitkerä.

Esimerkki 8

Esimerkin 1 A-kohdassa valmistettua hydrolysaattia otettiin 504 cm³. Tämä vastaa 168 g hydrolysaattikuiva-ainetta 100 cm³:a hartsia kohden. Liuos ajettiin regereroidun 5 30 cm³:n XAD-16 -pylvään läpi nopeudella 60 ml/h 30 °C:n lämpötilassa. Lopuksi pylväs huuhdottiin 40 cm³:llä 30-asteista vettä, joka yhdistettiin läpitulleeseen hydrolysaattiin. Nämä pakkaskuivattiin jauheeksi.

Ennen hartsikäsittelyä hydrolysaatti sisälsi B-LG-ekvivalentteja 3,9 µg/g kuiva-ainetta ja hartsikäsittelyn jälkeen 0,02 µg/g kuiva-ainetta eli vähennys oli 195-kertainen. Hydrolysaatti oli neutraalin makuinen vailla kitkeryyttä.

Esimerkki 9

15 Toimittiin kuten esimerkissä 8, mutta pylvääseen syötettiin kolminkertainen määrä (= 1512 cm³) hydrolysaattia 10 % liuoksena eli 151,2 g/30 cm³ hartsia (= 504 g hydrolysaattikuiva-ainetta 100 cm³:a hartsia kohti).

20 Käsittelyn jälkeen kuivattu hydrolysaatti sisälsi B-LG-ekvivalenttijäämiä edelleen vain 0,01 µg/g kuiva-ainetta eli vähennys oli 390-kertainen, mutta nyt käsitelty jauhe oli maultaan selvästi kitkerä.

Esimerkki 10

Esimerkissä 1A valmistettua hydrolysaattiliuosta
25 haihdutettiin 20 % kuiva-ainepitoisuuteen. 63 cm³ tätä tiivistettä ajettiin nopeudella 120 cm³/h regeneroidun 30 cm³:n XAD-16 -pylvään läpi 65 °C:ssa. Tämä vastaa 42 g hydrolysaatin kuiva-ainetta 100 cm³:a hartsia kohden. Lopuksi pylväs huuhdottiin 40 cm³:lla 65-asteista vettä. Liuokset
30 yhdistettiin ja kuivattiin jauheeksi. Ennen hartsikäsittelyä hydrolysaatin B-LG-ekvivalenttipitoisuus oli 3,9 µg/g kuiva-ainetta ja käsittelyn jälkeen 0,02 µg/g kuiva-ainetta eli vähennys oli 195-kertainen. Hydrolysaatti oli neutraalin makuinen vailla kitkeryyttä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä allergiaa aiheuttavien yhdisteiden poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, t u n -
5 n e t t u siitä, että

a) proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan proteolyyttisillä entsyymeillä proteiinihydrolysaatiksi, jonka hydrolyysiaste (alfa-amino-N/kok.N) on 20 - 60 %,

10 b) näin saatu hydrolysaatti kirkastetaan, edullisesti sentrifugoimalla tai ultrasuodattamalla ja kirkas liuos otetaan talteen,

c) saatu hydrolysaattiliuos johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi virtausnopeudella 0,2 - 4
15 pylvään tilavuutta tunnissa lämpötilassa 5 - 70 °C siten, että hydrolysaattiliuoksessa on 40 - 500 g kuiva-ainetta 100 ml hartsia kohti,

d) hartsikäsittelyn lopuksi pylväs huuhdotaan vedellä, jonka lämpötila on 5 - 70 °C,

20 e) otetaan talteen pylvään läpi tulleet liuokset,

f) talteenotetuista liuoksista poistetaan tarvittaessa suoloja, ja

g) talteenotetut liuokset konsentroidaan 40 - 70 % kuiva-ainepitoisuuteen ja haluttaessa kuivataan.

• 25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinipitoinen koostumus on heraproteiinia ja/tai kaseiinia sisältävä liuos.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteolyyttisenä entsyyminä
30 käytetään trypsiiniä, pankreatiinia tai mikrobiproteaasia tai niiden yhdistelmää.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa b) talteenotettu liuos konsentroidaan edullisesti 10 - 30 %
35 kuiva-ainepitoisuuteen ja haluttaessa se kuivataan edelleen

∴

jauheeksi, joka ennen jatkokäsittelyä liuotetaan kuumaan veteen.

5 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsina käytetään hydrofobista polystyreenirunkoista hartsia.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi johdetaan proteiinihydrolysaattiliuosta, jonka pH on 2 - 10, edullisesti 5,5 - 7,5.

10 7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hartsikäsittelylämpötila on 30 °C.

Patentkrav

1. Förfarande för avlägsning av allergiframkallande
föreningar ur proteinhaltiga sammansättningar, k ä n n e -
5 n e t e c k n a t därav att

a) proteinet i den proteinhaltiga sammansättningen
spjälks med proteolytiska enzym till ett proteinhydroly-
sat, vars hydrolysgrad (alfa-amino-N/tot.N) är 20 - 60 %,

b) det så erhållna hydrolysattet klaras, företrädes-
10 vis genom centrifugering eller ultrafiltrering, och den
klara lösningen tillvaratas,

c) den erhållna hydrolysatlösningen passeras genom
en med adsorptionsharts fylld kolonn med en strömningssha-
stighet av 0,2 - 4 kolonnvolym per timme vid en temperatur
15 av 5 - 70 °C, så att hydrolysatlösningen innehåller 40 -
500 g torrämne per 100 ml harts,

d) som en avslutning till hartsbehandlingen sköljs
kolonnen med vatten, vars temperatur är 5 - 70 °C,

e) de genom kolonnen passerade lösningarna tillva-
20 ratas,

f) av de tillvaratagna lösningarna avlägsnas salter
vid behov, och

g) de tillvaratagna lösningarna koncentreras till
en torrämneshalt av 40 - 70 % och torkas om så önskas.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
25 t e c k n a t därav att den proteinhaltiga sammansätt-
ningen är en lösning som innehåller vassleprotein och/el-
ler kasein.

3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n -
30 n e t e c k n a t därav att som det proteolytiska enzymet
används trypsin, pankreatin eller mikrobproteas eller en
blandning av dessa.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
k ä n n e t e c k n a t därav att den i steg b) till-
35 varatagna lösningen koncentreras till en torrämneshalt av

företrädesvis 10 - 30 % och torkas, om så önskas, vidare till ett pulver som före fortsatt behandling upplöses i hett vatten.

5 5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4, k ä n n e t e c k n a t därav att som adsorptionsharts används ett hydrofobt harts med polystyrenstomme.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 5, k ä n n e t e c k n a t därav att genom den med adsorptionsharts fyllda kolonnen passeras en proteinhydrolysatlösning med ett pH av 2 - 10, företrädesvis 5,5 - 7,5.
10

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6, k ä n n e t e c k n a t därav att hartsbehandlingstemperaturen är 30 °C.